(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(10) DE 197 00 788 A 1

(51) Int. Cl.[6]: A 61 K 35/78

(21) Aktenzeichen: 197 00 788.0
(22) Anmeldetag: 11. 1. 97
(43) Offenlegungstag: 16. 7. 98

DE 197 00 788 A 1

(71) Anmelder:
Ruepp, Michael O., 42853 Remscheid, DE

(74) Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col., 50667 Köln

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE-OS 21 62 190
CH 6 80 570 A5
US 50 47 435
US 48 98 891
EP 02 56 452 A2

Central Patents Index, Basic Abstracts Journal, D, Derwent Publications Ltd., London 1982, Ref. 74307 E/35 zu SU -878-239;
HÄNSEL,R., u.a.: Drogen E-O, Springer-Verlag, Berlin 1993, Bd.5, S.474-495;
LIST,P.H., HÖRHAMMER,L.: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Springer-Verlag, Berlin 1976, 4.Aufl., S.214-219;
DECOSTERD,Laurent A., et.al.: 55. New Hyperforin Derivatives from Hypericum revolutum VAHL with Growth-Inhibitory Activity against a Human Colon Carcinoma Cell Line. In: Helvetica Chimica Acta, Vol.72, 1989, S.464-471;
DITTMANN,J., u.a.: Normalisierung des Glukose-Stoffwechsels von Hirntumor-Schnitten durch Hyperosid. In: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), Jg.21, Nr.12, 1971, S.1999-2003;
Chemical Abstracts:
Vol.124, No.23, 1996, Ref. 306826e;
Vol.125, No.15, 1996, Ref. 185259g;
Vol.122, 1995, Ref. 229903g;
Vol.120, 1994, Ref. 124431g;
Vol.117, 1992, Ref. 204762u;
Vol.109, 1988, Ref. 104223k;
Vol. 78, 1973, Ref. 67532d;
Vol. 78, 1973, Ref. 66908u;
Vol. 71, 1969, Ref. 109791a;
Vol. 66, 1967, Ref. 103792b;
Vol.112, 1990, Ref. 69462a;
MEDLINE Abstracts:
Ref. 95160926;
Ref. 95160925;
Ref. 95159322;
Ref. 93257518;
Ref. 93257514;
Ref. 70012075;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Johanniskraut-Trockenextrakte

(57) Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von (Hypericum) Johanniskraut-Trockenextrakten zur Herstellung von Arzneimitteln sowie ein oral applizierbares Arzneimittel.
Die Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Johanniskraut(Hypericum)-Trockenextrakten zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Erkrankungen des Dünndarms (medikamenten- oder infektionsbedingte Schädigungen), des Knochenmarks (Aplasie und Insuffizienz, zum Beispiel als Folge von medikamenten- oder strahlenbedingter Agranulozytose), des Thymus (Dysfunktion, A- oder Hypoplasie), der Milz (Dysfunktion), Lymphknoten (A- oder Hypoplasie infolge medikamenten- oder strahlenbedingter Schädigung) - zur adjuvanten Behandlung - auch in Kombination mit Chemopharmaka - der Analgesie - der koronaren Herz-Krankheiten (KHK), Leber- und Nierenkrankheiten, der Hypertonie, des Tinnitus sowie maligner Tumore, insbesondere von Mamma-, Portio- oder Kolonkarzinom.

DE 197 00 788 A 1

«SDOCID <DE_19700788A1_I_>»

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Johanniskrautextrakten zur Herstellung von Arzneimitteln sowie ein oral applizierbares Arzneimittel.

Bereits die Völker der Antike benutzten Johanniskraut (Hypericum-Arten als Heilmittel.

Aus Roempp Chemielexikon, 9. Auflage, S. 2099, (1990) ist zu entnehmen, daß Johanniskraut seit altersher gegen Gallen-, Blasen-, Leber- und Magenbeschwerden, Kopfweh, Gicht, Rheuma, als mildes Sedativum und zur Wundheilung arzneilich gebraucht wird, wovon Namen wie Wund-, Wurm-, Sonnwend-, Gottesgnaden-, Herrgottswunder-, Hexen-, Hexen-, Teufelsflucht-kraut, Elfenblut, Mannskraft und andere zeugen. Die Pflanze enthält bis 1% ätherisches Öl mit α-Pinen, Myrcen, Cadinen, Gurjunen und Isovaleriansäureestern, außerdem (besonders in den Blüten) die Flavonoide, Quercetin, sein 3-Galactosid (Hyperin) und Rutin sowie Quercitrin und Isoquercitrin. Arzneilich genutzt werden das zur Blütezeit gesammelte Kraut als Tee oder in Form daraus gewonnener Tinkturen sowie das durch Ölauszug (zum Beispiel mittels Olivenöl) aus den frischen Blüten gewonnene tiefrote klare Johanniskrautöl, das ca. 0,004% Hypericin enthält.

Präparate, die Johanniskraut (Herba Hyperici) enthalten, werden oral bei psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst und nervösen Unruhezuständen angewendet. Üblicherweise werden Tees, Tropfen und feste Formen wie Kapseln, Dragees und Filmtabletten beziehungsweise Tabletten eingesetzt.

Die Hauptinhaltsstoffe, die im wesentlichen das wirksame Prinzip darstellen sind die Dianthrone, darunter das Hypericin.

Die DE 42 39 959 A1 betrifft ein Trockenextrakt aus dem Kraut von Hypericum perforatum L., der durch einen, gegenüber dem Hypericingehalt der als Ausgangsmaterial eingesetzten Droge verminderten Hypericingehalt gekennzeichnet ist.

Die DE 44 34 170 C1 beschreibt peroral applizierbare Johanniskrautextrakte, die die nicht flüchtige Phase des Extraktes an Polyvinylpyrrolidon in mikrodisperser Form und/oder in Form einer festen Lösung gebunden enthalten.

Demgegenüber steht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung von neuen Anwendungsformen für Johanniskrautextrakten.

Die vorstehend genannte Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von Johanniskraut (Hypericum)-Trockenextrakten zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Erkrankungen des Dünndarms (medikamenten- oder infektions-bedingte Schädigungen), des Knochenmarks (Aplasie und Insuffizienz, zum Beispiel als Folge von medikamenten- oder strahlenbedingter Agranulozytose), des Thymus (Dysfunktion, A- oder Hypo-plasie) der Milz (Dysfunktion), Lymphknoten (A- oder Hypo-plasie infolge medikamenten- oder strahlenbedingter Schädigung) – zur adjuvanten Behandlung – auch in Kombination mit Chemopharmaka – der Analgesie – der koronaren Herz-Krankheiten (KHK), Leber- und Nierenkrankheiten, der Hypertonie, des Tinnitus sowie maligner Tumore, insbesondere von Mamma-, Portio- oder Kolonkarzinom.

Die erfindungsgemäße Verwendung von Johanniskraut-Trockenextrakten erstreckt sich auf den Bereich von Humanarzneimitteln sowie auf Tierarzneimitteln.

Erfindungsgemäß wurde das Johanniskraut allein sowie in Kombination mit einem Standardantidepressivum in Kombination untersucht. Der Johanniskrautextrakt induzierte im Vergleich mit einer Kontrollgruppe eine stark numerische Zunahme aller lymphatischen Zelltypen im peripheren Blut. Besonders ausgeprägt war die Zunahme der B-Lymphozyten. Auffallend war, daß Johanniskrautextrakt nicht die Zellzahlenwerte der segmentkernigen Granulozyten erhöhte, was sich in einer deutlichen Verschiebung zugunsten der relativen Zellzahlenwerte der Lymphozyten Subpopulation auswirkte.

Bei der Verwendung des Standardantidepressivums Maprotilin zeigte sich ein deutlich suppressiver Effekt auf die Zellzahlenwerte der B-Lymphozyten mit einer Abnahme im Vergleich zu dem entsprechenden Wert der Kontrollgruppe. Unter Maprotilinbehandlung fand ein Zellzahlenzunahme der segmentkernigen Granulozyten im peripheren Blut statt. Die makromorphologischen Befunde der lymphatischen Organe zeigten eine Gewichtsreduktion des Thymus und eine Zunahme des Milzgewichtes, sowie eine makroskopisch erkennbare Reduktion der Peyerschen Plaques.

Die Anzahl der Leukozyten, Lymphozyten, T-, B-, Helfer- und Suppressorzellen in den Behandlungsgruppen, die Johanniskrautextrakt gegebenenfalls in Kombination mit dem genannten Standarddepressivum enthielten, nahmen im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu in gleicher prozentualer Größenordnung zu. Hierdurch konnte belegt werden, daß das immunsuppressive Potential von Maprotilin unter simultaner Applikation von Johanniskrautextrakten auf die Morphologie von Peyerschen Plaques, Thymus und Milz sowie auf die Granulozyten-Ausschüttung in das periphere Blut und auf die Zellzahl der B-Lymphozyten und Suppressorzellen gemindert oder vollständig aufgehoben wurde.

Das quantitativ definierte Immunpotential von Johanniskrautextrakt wirkte deutlich protektiv gegen das dominant B- und Suppressorzell-zytotoxische Potential von Maprotilin. Daraus ist abzuleiten, daß Johanniskrautextrakte aufgrund der Art ihres breiten, unspezifischen Lymphozyten- und Lymphozytenpopulation-stimulierenden Spektrums die Verträglichkeit einer Therapie mit chemisch definierten Antidepressiva – als auch mit anderen lymphozytisch wirkenden Therapeutika – verbessert und lymphozytäre Mangelzustände aufgrund einer Chemo- oder Radiotherapie oder einer Infektion, die in einer klinischen Studie mit HIV-Patienten belegt ist, therapeutisch begünstigt.

Auf der Basis der erfindungsgemäßen experimentellen Untersuchungsergebnisse konnte die durch umfangreiche klinische Studien gesicherte hypericumspezifische Wirkung auf depressive Verstimmungszustände gestützt werden. Für diese Hypothese spricht die Einflußnahme von Johanniskrautextrakten auf bestimmte Parameter des Immun- und Neurotransmittersystems sowie die deutliche Stimulation der Zellzunahme von T- und B-Lymphozyten, von Helfer- und Suppressorzellen und die simultan auftretende deutliche Suppression des Noradrenalinspiegels.

Nach simultaner Applikation von Maprotilin und Hypericum lassen sich die durch alleinige Applikation von Maprotilin induzierten Organläsionen in Form von Atrophie der hämatopoetischen Zellelemente des Knochenmarks der lymphopoetischen Zellelemente von Thymus, Milz, mesenterialer Lymphknoten und Peyer-Plaques partiell oder vollständig aufheben.

Das gleiche trifft für die Alteration von Leber, Pankreas und Nieren in Form von funktioneller Hypertrophie der He-

NSDOCID <DE 19700788A1 >

patozyten. Anzeichen beginnender [redacted]phie der B-Zellen und der hyalintropfigen Entar[redacted] der Nierenepithelien zu.

Diese Resultate erlauben die Interpretation, daß die partielle beziehungsweise vollständige Regeneration definierter Organsysteme auf eine protektive und kurative Wirkung von Hypericum bei simultaner Applikation mit der zytotoxischen Substanz Maprotilin zurückzuführen sind.

Unter diesen Aspekten bietet sich der Analogieschluß an, daß Hypericum auch zur adjuvanten Behandlung von Organerkrankungen unterschiedlichster ätiologischer Pathogenese (Infektionen, Intoxikationen als Folge von medikamentöser oder radiologischer Behandlung) auch in Kombination mit Chemopharmaka zur Anwendung gelangten.

Die protektiven und kurativen Effekte von Hypericum auf lymphoretikuläre Organe (Milz, Thymus, Lymphknoten einschließlich Peyer-Plaques) können auch unter einem anderen Gesichtspunkt von großer Bedeutung sein, da in jüngster Zeit die verschiedenen Reaktionsformen des Lymphknotens eine praktische therapeutische Bedeutung erlangt haben: wird zum Beispiel im Drainagegebiet von Karzinomen (Mammakarzinom, Portiokarzinom) eine Stimulation der T-Zellen (Parakortikalzone) beobachtet, so besteht bei den Patienten eine bessere Prognose als bei denen, die lediglich eine Aktivierung der B-Zellen-Region erkennen oder keine Reaktion des Lymphknotens nachweisen lassen.

Die erfolgreiche Abwehr belebter äußerer Krankheitsursachen durch das körpereigene Immunsystem hängt ganz entscheidend von der Stärke und Qualität der Immunreaktion des Wirtes ab. Eine intakte, zelluläre und humorale Abwehr des Wirtorganismus kann Entstehung und Ausbreitung eines Tumors in Schach halten. Die wesentlichste Quelle der Abwehrschwäche heutzutage ist aber die zytostatische Chemotherapie bei Krebspatienten

Letztendlich kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Hypericumpräparation in oraler Applikationsform therapeutisch als Adjuvanz der malignen Tumorbehandlung sowie der chemozytostatischen und radiologischen Tumorbehandlung geeignet ist.

Unter pharmakodynamischen Aspekten beeinflußt Hypericum einerseits definierte Funktionen einzelner Targetorgane andererseits zusätzlich bestimmte Regulationsmechanismen weiterer Organsysteme. Daraus resultieren positive Wechselwirkungen endokriner, neuronaler und immunologischer Regelkreise.

Weiterhin wurde der Einfluß auf den Grad der Depression sowie der Grad der Schmerzintensität untersucht. Mit Hilfe einer abgestuften Autoevaluationsskala wurde generell die Schmerzsymptomatik erfaßt. Bekanntermaßen wird beim körperlichen Schmerz unterschieden in Entzündungs-, Nerven-, spastischem Schmerz sowie Fehlregulationsschmerz. Der körperliche Schmerz von Tumorpatienten wird oft als zentrales Ereignis angesehen, da dieser häufig eine Reihe weiterer Schmerzerlebnisse auslöst. Die begleitenden psychosomatisch bedingten Schmerzen sind durch Symptome wie depressive Verstimmung, Antriebsarmut, subjektive Eingeengtheit auf die Grunderkrankung, Schlafstörungen, Suizidgedanken und Incompliance bezüglich der analgetische Medikation charakterisiert.

Unter diesen Aspekten werden generell bei Tumorpatienten frühzeitig zentral wirkende Analgetika wie Codein, Dehydrocodein, Tramadol, Dextropyropoxyphen oder Tilidin in Kombination mit Naloxon eingesetzt. Diese synthetischen Analgetika zeigen monotherapeutisch nach längerer Behandlungszeit auch Nebenwirkungen, so daß eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung dahingehend zu definieren ist, mit Hilfe von Johanniskrautextrakten adjuvant zur onkologischen Schmerztherapie beizutragen, um im Vergleich mit entsprechenden Mono-Opioid-Behandlung geringeren Nebenwirkungen, eine Reduktion der Opioid-Dosis sowie einer Minderung des tumorbedingten Schmerzsyndroms zu führen.

Erfindungsgemäß konnte gefunden werden, daß Johanniskrautextrakte als Coanalgetikum der Opioid-Therapie bestimmter Zustande wirksam ist. Demgemäß konnte die zur Analgesie notwendige Dosis verschiedener Oploide signifikant gesenkt werden.

Bei allen behandelten Patienten traten im Vergleich mit der Opioid-Monotherapie unter simultaner Applikation von Johanniskrautextrakten und Opioiden Besserungen des Beschwerdebildes auf. Beeindruckend war oft die Verbesserung der depressiven Stimmungslage und der Schlafstörung (Symptome des Schmerzsyndroms) sowie eine subjektiv empfundene Reduktion der körperlichen Schmerzen bei einer durchschnittlichen Reduktion der Analgetikadosis um mehr als 1/4.

Allgemein wurde die Verträglichkeit der oralen Opioid-Applikation zum einen durch die Dosisreduktion der Opioide zum anderen durch die simultane Applikation mit Johanniskrautextrakten deutlich verbessert.

Bei der zellulären Immunstimulation ist erfindungsgemäß eine Zunahme der Zellzahlen von Leukozyten, Lymphozyten, T-, B-, Helfer-, Suppressor- und NK-Zellen zu beobachten.

Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Johanniskrautextrakten in Kombination mit chemisch definierten Antidepressiva, lymphozytolytisch wirkenden Therapeutika und/oder zentral wirkenden Analgetika.

Als Applikationsform bietet sich die Frischpflanze, insbesondere Preßsaft, in getrockneter Form, insbesondere Pulver oder Aufguß, als Tinktur, insbesondere Tropfen, Granulat, insbesondere Kapsel, und als Tablette, insbesondere Dragee oder Pastille an. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung wird als Auszugsmittel der Pflanze Methanol eingesetzt.

Ausführungsbeispiel

Material und Methode

Tiere und Tierhaltung

Männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 333 g wurden unter konventionellen Bedingungen bei Raumtemperatur (21 +/- 1°C) in einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 60% und einem 12 Std.-Tag/nach-Rhythmus gehalten. Sie unterlagen vor Versuchsbeginn einer Akklimatisation von 12 Tagen an diese Haltungsbedingungen.

Die Ernährung erfolgte mit einer pelletierten Standarddiät Altromin C 1000 Misch. Nr. 100 (Firma Altrogge, Lage).

NSDOCID <DE_19700788A1_I_>

Als Trinkwasser erhielten [redacted] iere Leitungswasser ad libidum.

Prüfsubstanzen

a: Drageekerngranulat mit
Trockenextrakt aus getrocknetem Kraut von Hypericum perforatum L., Auszugsmittel hier Methanol
1 Drageekern mit 300 mg enthält Johanniskrautextrakt 5,4 : 8,3 = 1:150 mg mit mindestens 0,1% Gesamthypericin nach DAC 86
Applikationsform: Hypericum-Granulat 2 mg (= 1 mg nativer Trockenextrakt) werden in 0,02 ml Aqua dest. suspendiert (HPS).
b: Maprotilin
Applikaktionsform: Maprotilinmethansulfonat 25 mg in 5 ml (MAL)

Applikation

HPS und MAL wurden einmal täglich 7 Tage lang den nicht sedierten Tieren intragastral mit Hilfe einer starren Knopfsonde verabreicht. Die Suspension wurde unmittelbar vor ihrer Applikation frisch hergestellt und homogen appliziert, die Lösung MAL wurde unverändert den Ampullen entnommen und verabreicht.

Dosis und Behandlungsgruppen

14 männliche Wistar-Ratten wurden zur Untersuchung in folgende Behandlungsgruppen eingeteilt:

Gruppe:		Dosis: (mg/kg KGW)	Tierzahl:
I Kontrollgruppe	(Vergleich)	--	5
II HPS	(Erfindung)	100	5
III MAL*	(Vergleich)	10	2
IV HPS + MAL*	(Erfindung)	100 + 10	2

*Die Gruppen III und IV umfaßten jeweils nur 2 Tiere, wurden jedoch aufgrund ihrer Homogenität bezüglich der ausgelösten Veränderungen als ein Kollektiv betrachtet.

Blutentnahme

Am 7. Behandlungstag wurde den Tieren 2 Stunden nach der Applikation 2×500 µl Blut aus den tetroorbitalen Venenplexus entnommen, in Natrium EDTA beschichtete Gefäße gefüllt und gut durchmischt.

Analytische Methode

Immunphänotypisierung

Die Leukozytendifferenzierung wurde mit Hilfe des Durchflußzytometers FACScan® nach entsprechender Lysierung der Vollblutprobe durchgeführt (Streulichtmessung).

Die Lymphozytendifferenzierung erfolgte nach spezifischer monoklonaler Inkubation mittels fluoreszensaktivierter Zellsortierung (Fluoreszensmessung).

Quantitativ wurden am 7. Behandlungstag analysiert:
Leukozyten (gesamt), Lymphozyten (gesamt),
T-Lymphozyten (CD2+/CD45 RA -),
B-Lymphozyten (CD2-/CD45 RA+),
Helfer-Lymphozyten (CD4-/CD8b+),
sowie NK-Zellen (CD8a+/CD8b-).

Zur Phänotypisierung der Lymphozyten wurden diese mit folgenden Antikörpern der Fa. Pharmingen, San Diego USA inkubiert, an welche ein Fluorochrom gekoppelt ist:
Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conjugated Mouse Anti-Rat CD 2 Monoclonal Antibody, Phycoerythrin (R-PE) conj. Mouse Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody, Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Mouse Anti-Rat CD 4 Monoclonal Antibody, R-Phycoerythrin (R-PE) conj. Mouse Anti-Rat CD8 (β-Chain) Monoclonal Antibody, Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conj. Mouse Anti-Rat CD8a Monoclonal Antibody.

Ansatz:

a) CD2/CD45RA = T- und B-Zellen
b) CD4/CD8b = T_4- und T_8-Zellen
c) CD8a/CD8b = NK-Zellen

NSDOCID: <DE__19700788A1_I_>

Je 5 µl Antikörper wurden mit 50 µl Na-EDTA-Blut bei Zimmertemperatur im Dunkeln 20 min lang inkubiert. Die Suspension wurde mit 2 ml Lyses Reagenz der Fa. Becton-Dickinson geschüttelt und wie beschrieben 10 min lang inkubiert. 6 min lang wurde anschließend bei 400 G zentrifugiert, der Überstand abgegossen. Das Sediment wurde mit 3 ml Cell-Wash gewaschen und 6 min lang bei 400 G zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl Cell-Wash aufgenommen. Die Suspension wurde mit Hilfe des Durchflußzytometers analysiert.

Bestimmung von Catecholaminen und Serotonin

Adrenalin und Noradrenalin wurden on-line mittels Phenylborsäure aus der Matrix isoliert, anschließend mit Hilfe einer Ionenpaarphase auf einer HPLC-Säule getrennt, zu Trihydroxyindolen (THT) in Reaktionskapillaren derivatisiert und fluorimetrisch detektiert

Klinische Beobachtungen

Während der Akklimatisation vor Versuchsbeginn und im Verlauf der gesamten Versuchsdauer wurde das Allgemeinbefinden der Tiere kontrolliert. Zusätzlich erfolgte täglich eine Bestimmung des Körpergewichts.

Alle Tiere überstanden die intragastrale Applikation ohne Beeinträchtigungen. Die Tiere, die mit den Prüfsubstanzen behandelt wurden, zeigten kein nachteiliges Verhalten. Während der Behandlungsperiode stieg das durchschnittliche Körpergewicht in gleicher Weise in den Gruppen nur gering.

Makromorphologische Befunderhebung von Milz und Thymus

Die mittleren Organ-Gewichte von Milz (+22%) und Thymus (–46,8%) der Gruppe III (MAL) wichen im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe deutlich ab. Die makroskopische Ausprägung der Peyerschen Plaques war in der Gruppe III (MAL) sehr deutlich reduziert im Vergleich mit der Gruppe I (Kontrollgruppe), mit der Gruppe II (HPS) sowie mit der Gruppe IV (HPS+MAL).

Hämatologische und klinisch-chemische Ergebnisse

Leukozytendifferenzierung

Die Immunpotentiale der Prüfsubstanzen in den Gruppen II, III und IV wurden indirekt durch ihre Induktionswirkung auf die Zunahme der Anzahl immunkompetenter Zellen im peripheren Blut bestimmt. Die Proben wurden in-vitro durchflußzytometrisch analysiert, wobei die Messung der Zellgröße und der Granularität aufgrund der Registrierung entsprechender Streuintensität die Diskriminierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ermöglicht.

In der erfindungsgemäßen Behandlungsgruppe II stiegen im Vergleich mit der Kontrollgruppe die mittleren Zellzahlwerte bei den Leukozyten um 27,6%, bei den Granulozyten um 3,6% und bei den Lymphozyten um 39,1%.

In der Vergleichsgruppe III nahmen im Vergleich mit der Kontrollgruppe die Leukozyten um 1,2%,und die Lymphozyten um 8,5% ab. Die Granulozyten jedoch verzeichneten hier eine deutliche Zunahme um 28,5%.

In der erfindungsgemäßen Behandlungsgruppe IV war der Anstieg bei allen leukozytären Zelltypen mit Ausnahme der segmentkernigen deutlicher ausgeprägt als in der Gruppe III. Hier stieg die Anzahl der Leukozyten um 24,3%, der Granulozyten um 12,5% und der Lymphozyten um 32,8%.

Die Lymphozytenzahl war in Gruppe III erniedrigt (–8,5%), die entsprechenden Werte in Gruppe II und Gruppe IV waren deutlich erhöht (+39,1% und + 32,8%).

Die relative Darstellung der prozentualen Zellzahlverhältnisse war nicht homogen. Die Werte der Gruppe III waren im Vergleich mit den Werten der Gruppe I deutlich erhöht, diejenigen der Gruppe II und IV erniedrigt, obwohl die absoluten Zellzahlen dieser Gruppen nicht wesentlich von denjenigen der Kontrollgruppe abwichen. Hingegen zeigte der Vergleich der relativen Zellzahlverhältnisse der Lymphozyten in Bezug zu den Leukozytenwerten in allen Gruppen ein homogenes Muster.

Hypericum induzierte im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich die Zellzahlwerte der Lymphozyten jedoch nicht die der Granulozyten. Maprotilin hingegen induzierte eine starke Zunahme der Zellzahlen der Granulozyten bei gleichzeitiger mäßiger Reduktion der Lymphozytenwerte. Die Veränderungen wurden unter simultaner Applikation deutlich in Richtung der entsprechenden Zellzahlwerte der Kontrollgruppe gemindert.

Lymphozytendifferenzierung

Die Stärke der Immunpotentiale der Prüfsubstanzen in den Gruppen II, III und IV wurde hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung außerdem auf die Änderung der Zellzahlen bestimmter Lymphozytensubpopulationen bestimmt. In-vitro wurden T- und B-Zellen, Helfer- und Suppressor-Zellen sowie NK-Zellen durchflußzytometrisch mit Hilfe der Immunfluoreszenz differenziert und quantitativ erfaßt.

In der erfindungsgemäßen Behandlungsgruppe II stiegen deutlich die mittleren Werte der Zellzahlen der B-Lymphozyten um 60,6% im Vergleich mit den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe. In der Vergleichsgruppe III hingegen nahmen die B-Lymphozyten um 33,2% ausgeprägt ab.

In der erfindungsgemäßen Behandlungsgruppe IV stieg die Anzahl der B-Zellen um 31% und somit weniger deutlich als im Vergleich mit dem entsprechend Wert (+60,6 %) der Gruppe II.

Die absoluten Zellzahlen der T-Lymphozytensubpopulation in den Gruppen II und IV mit +25,6% beziehungsweise + 34,1% im Vergleich mit den entsprechenden Zellzahlen der Kontrollgruppe waren deutlich verändert. Die entsprechen-

...OCID <DE_19700788A1_I_>

den Werte der Gruppe III w[illegible]cht erh[illegible]t.

Die relativen Zellzahlwerte der b- und T-Lymphozyten wichen von den Werten der Kontrollgruppe in der Gruppe II mit +14,9% beziehungsweise -9,6% und in der Gruppe III mit umgekehrten Vorzeichen mit -20,7% beziehungsweise +6,9% ab. Auffallend war, daß die relativen Werte der B- und T-Lymphozyten der Gruppe IV nicht von denen der Kontrollgruppe abwichen.

Das Niveau der absoluten Zellzahlwerte der Helferzellen der Gruppen IV und II lag in beiden Fällen (+21,7% beziehungsweise +23,7%) nahezu gleich über demjenigen der Kontrollgruppe. Der entsprechende Wert der Gruppe II war im Vergleich mit dem der Kontrollgruppe unverändert. Ein vergleichbares Bild der absoluten Zellzahlzunahme zeigte sich hinsichtlich der Suppressorzellen in Gruppe II mit + 31,1% und Gruppe IV mit 25,2%. Eine Abnahme der Zellzahl dieser Art wurde jedoch in Gruppe III registriert (-29,7%).

Im Vergleich mit den absoluten Zellzahlwerten zeigt sich, daß die entsprechenden relativen Werte der Effektor- und der Suppressorzellen zwischen den Gruppen II und IV nahezu wertmäßig übereinstimmen. Die relativen Zellzahlwerte der Gruppe III waren im Vergleich mit den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe im Kompartiment der Effektorzellen erhöht und der Suppressorzellen deutlich erniedrigt.

Der Quotient aus den absoluten Zellzahlwerten der Helfer- und der Suppressorzellen je Behandlungsgruppe der Gruppe III durch die von Gruppe IV sank auf das Quotientenniveau der Kontrollgruppe.

Erythrozyten

Die Behandlung der Tiere mit den Prüfsubstanzen hatte keinen Einfluß auf die absolute Zellzahl der Erythrozyten.

Vergleich der Immunpotentiale

Der Extrakt aus Hypericum perforatum L. (HPS) – Auszugsmittel Methanol – induzierte im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine starke numerische Zunahme aller lymphatischen Zelltypen im peripheren Blut. Besonders ausgeprägt ist die Zunahme der B-Lymphozyten mit ca. 60%. Auffallend war, daß HPS nicht die Zellzahlwerte der segmentkernigen Granulozyten erhöhte. Dies wirkte sich in einer deutlichen Verschiebung zugunsten der relativen Zellzahlwerte der Lymphozytensubpopulation aus.

Maprotilin zeigte einen deutlich suppressiven Effekt auf die Zellzahlwerte der B-Lymphozyten mit einer Abnahme um über 30% im Vergleich zu dem entsprechenden Wert der Kontrollgruppe. Unter Maprotilin-Behandlung fand eine Zellzahlzunahme der segmentkernigen Granulozyten (+ ca. 33%) im peripheren Blut statt. Bekannt ist, daß hinsichtlich der Knochenmarkzellen zytotoxische Substanzen eine Ausschüttung von Granulozyten ins periphere Blut bewirken. Diese Folgerung wurde durch die pathogen makromorphologische Befunderhebung der lymphatischen Organe Milz und Thymus gestützt. Der Thymus wurde unter Maprotilin zellzahlmäßig entspeichert (Gewichtsreduktion um 46,8%); die Milz hingegen nahm an Gewicht (+22%) zu.

Diese Beobachtung wie auch die makroskopische Reduktion der Peyerschen Plaques unter Maprotilin-Behandlung ließ folglich den Schluß zu, daß die B-Lymphozyten infolge der Funktionseinschränkung der Peyerschen Plaques und des Abbaus der B-Lymphozyten in der Milz zahlenmäßig vermindert im peripheren Blut zirkulieren.

Dieses Wirkungsspektrum war deshalb von besonderer Bedeutung für die Erklärung der Wirkungsweise von HPS, das die simultane Applikation von HPS und MAL alle als pathologisch eingestuften Effekte von Maprotilin auf die Morphologie von Thymus und Milz, auf die Granulozyten Ausschüttung in das periphere Blut, auf die Anzahl insbesondere der B-Lymphozyten und Suppressorzellen im peripheren Blut – mindert oder vollständig aufhebt.

Bestimmung von Catecholaminen und Serotonin

Der Extrakt von Hypericum perforatum L – Auszugsmittel Methanol – zeigte im Vergleich mit der Kontrollgruppe keinen Einfluß auf den Serotonin- beziehungsweise Adrenalingehalt im peripheren Blut. Im Gegensatz dazu ließ sich jedoch ein ausgeprägter Einfluß auf den Noradrenalingehalt nachweisen: in der Behandlungsgruppe II wurde dieser im Vergleich zur Kontrollgruppe um 83% gesenkt.

Der Serotoningehalt war im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Gruppe III deutlich erniedrigt (20,8%). Dieser Effekt wird durch die Gruppe IV wieder aufgehoben.

Histologische Befunde

Peyer Plaques

Die Peyer Plaques des Dünndarms zeigten unter Maprotilinbehandlung Anzeichen einer Atrophie mit Entspeicherung der Lymphozyten vor allem in der Rindenzone. Keimzentren waren kaum noch zu erkennen.

Die simultane Behandlung in-vivo mit Maprotilin und Hypericum zeigte keine histopathologische Veränderung sondern im Gegensatz eine unveränderte Mikroarchitektur mit reichlich vitalen Lymphozyten in der Rindenzone und erkennbaren Rindenfollikeln, vergleichbar mit den Peyer Plaques der Kontrolltiere.

Sternales Knochenmark

Das sternale Knochenmark (H E-gefärbte Paraffinschnitte) zeigte unter Maprotilinbehandlung Anzeichen eines veränderten Zellgehaltes in den Markhöhlen. Darüber hinaus waren lichtmikroskopisch Änderungen des quantitativen Verhaltens der Blutbildungselemente im Knochenmark feststellbar:
die kernhaltigen Vorstufen der Erythropoese waren stark reduziert, diejenigen der Granulozytopoese waren vorhanden,

NSDOCID <DE__19700788A1_>>

wobei aber auffiel, daß es zu einer gewöhnlich starken Ansammlung stab- und segmentkerniger, das heißt reifer, neutrophiler Granulozyten kam. Außerdem schien auch die Anzahl eosinophiler Granulozyten erhöht zu sein.

Die simultane Behandlung in-vivo mit Maprotilin und Hypericum zeigte im sternalen Knochenmark bei der lichtmikroskopischen Untersuchung eine charakteristische Buntheit des Markbildes, die auf den ersten Blick dem der Kontrollgruppe entsprach. Allgemeine Veränderungen des Zellgehaltes waren nicht diagnostizierbar, es wurden wieder multiple kernhaltige Knochenmarkelemente der Erythropoese angetroffen, der Gehalt an reifen neutrophilen Granulozyten war deutlich zurückgegangen, lag aber noch etwas über dem Gehalt der Kontrollen.

Thymus

Der Thymus zeigte unter der Maprotilinbehandlung histologisch die charakteristische Mikroarchitektur, wobei Rinden- und Markzone deutlich zu unterscheiden waren. Insgesamt erschienen die Zonen schmaler als bei den Kontrollen, Zeichen einer generellen Atrophie, was mit der mikroskopischen Befunderhebung übereinstimmte. Insbesondere in der Rindenzone imponierte eine Verminderung der Lymphozyten.

Die simultane Behandlung in-vivo mit Maprotilin und Hypericum zeigte im Thymus die charakteristische Mikroarchitektur, wobei die Differenzierung von Rinden- und Markzone mit den Verhältnissen der Kontrollen vergleichbar waren, wobei aber aufgrund der Breite dieser Zonen und deren Relation zueinander sowie des Gehaltes der Rindenzone an vitalen Lymphozyten eine Hyperplasie des lymphatischen Gewebes erkennbar wurde.

Milz

Die Milz zeigte unter Maprotilinbehandlung histologisch eine Atrophie der weißen Pulpa mit einer mittel- bis hochgradigen Lymphozytenentspeicherung.

Die simultane Behandlung in-vivo mit Maprotilin und Hypericum zeigte histologisch die charakteristische Mikroarchitektur dieses Organs mit stärker als bei den Kontrollen entwickelter weißer Pulpa mit entsprechenden Lymphozytenqualitäten und Lymphozytenquanitäten im Zentrum der Follikel und periarteriellen Scheiden (PALS) und den zugehörigen Randzonen.

Mesenterialer Lymphknoten

Der mesenteriale Lymphknoten zeigte unter Maprotilinbehandlung histologisch eine Atrophie des lymphatischen Gewebes mit deutlicher Verminderung der Lymphozytenzahl in der Rindenzone und Fehlen der Randfollikel. Die parakortikale Zone hob sich färberisch und durch ihren höheren Gehalt an Lymphozyten deutlich von der Rindenzone ab.

Die simultane Behandlung in-vivo mit Maprotilin und Hypericum zeigte im mesenterialen Lymphknoten histologisch die charakterische Mikroarchitektur mit zahlreichen Rindenfollikeln und einen fließenden Übergang zur parakortikalen Zone aufgrund identischer Zellqualitäten.

Leber und Pankreas

Die Leber und endokrines Pankreas zeigten unter der Behandlung von Maprotilin leicht mikroskopisch erkennbare Hinweise auf Funktionsbelastungen, die bei simultaner Behandlung mit Maprotilin und Hypericum wieder aufgehoben wurden.

Nieren

Die Nieren zeigten unter der Behandlung mit Maprotilin histologisch erkennbare toxische Schädigungen in Form einer hyalintropfigen Entartung der Hauptstückepithelien, die bei simultaner Behandlung in-vivo mit Maprotilin und Hypericum nicht mehr nachweisbar sind.

Patentansprüche

1. Verwendung von Johanniskraut-Trockenextrakten zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von strahlen-, infektions- und chemisch-bedingten Organ- und Gewebeschädigungen, insbesondere des O-Malt-Systems des Dünndarms, des Knochenmarks, des Thymus, der Milz und der Lymphknoten, der Leber und der Nieren sowie von allgemein immunsupprimierten Zuständen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zelluläre Immunstimulation eine Zunahme der Zellzahlen von Leukozyten, Lymphozyten, T-, B-, Helfer-, Suppressor- und NK-Zellen umfaßt, insbesondere zur Behandlung von Leukozytopenie, Granulozytopenie, Lumphozytopenie, Immunglobulinmangelzuständen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Behandlung von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels und der Leberfunktion, zur adjuvanten Behandlung von prädiabetischen, insbesondere senilen Verlaufsformen, zur adjuvanten Behandlung von latenter diabetischer Stoffwechsellage, insbesondere bei Schwangerschaft, Infektion, Streß und als adjuvante Therapie des Alters-Diabetes mellitus.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 als orales Adjuvanz der malignen Tumorbehandlung, insbesondere der Behandlung von Mammakarzinom, Portiokarzinom oder Kolonkarzinom.
5. Verwendung nach Anspruch 1 zur Steigerung der Verträglichkeit von chemozytostatischer, radiologischer Therapie, insbesondere in Kombination mit chemisch-definierten Substanzen, ausgewählt aus Maprotilin, ACE-Hemmern, Ca-Antagonisten, Diuretika, Analgetika – insbesondere Codein, Dihydrocodein, Tramadol, Dextropyropexyphen, zur Abnahme des Plasma-Noadrenalinwertes, als Adjuvanz der Analgesie-, Hypertonie- und Tinnitus-Be-

SDOCID <DE_19700788A1_I_>

handlung, insbesondere pharmakologische Komponente der positive[illegible]nflussung der Wechselwirkungen zwischen Endokrinum, Nerven- und Immunsystem.

6. Verwendung nach Anspruch 1, 2 und 8 als Coanalgetikum in Kombination mit Analgetika oder Opioiden, insbesondere mit Codein, Dihydrocodein, Tramadol, Dextropyropoxyphen oder Tilidin.

7. Verwendung nach Anspruch 1 und 2 als Adjuvanz bei der Behandlung von bakteriell- und viral-induzierten Krankheitsbildern, insbesondere Hautläsionen (Ulcus crucis), wie Herpes simplex.

8. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 als Frischpflanze, insbesondere Preßsaft in extrahierter Form mit Hilfe von wäßrigen, organischen oder überkritischen Lösungsmitteln, insbesondere Kohlendioxid, in getrockneter Form, insbesondere Pulver, Granulat, insbesondere Kapsel und als Tablette, bevorzugt Dragee oder Pastille.

9. Oral applizierbares Arzneimittel enthaltend Johanniskraut (Hypericum)-Trockenextrakte in Calciumcarbonat- und Saccharid-haltiger Granulatform.

BNSDOCID: <DE__19700788A1_I_>